DOI:10.11931/guihaia.gxzw201812037

马尾松细胞分裂素羟化酶基因 *PmCYP735A* 克隆与表达分析

徐梦璇[1,2]，吴玲[1,2]，类彦东[1,2]，徐立安[1,2*]，胥猛[1,2]

（1. 南京林业大学，南方现代林业协同创新中心，南京 210037；

2. 南京林业大学林学院，南京 210037）

摘要：细胞分裂素是一类促进细胞分裂与分化的腺嘌呤衍生物，广泛参与植物器官形态建成及胁迫响应。细胞分裂素羟化酶 CYP735A 属于细胞色素 P450 单加氧酶家族成员，它通过羟基化作用调控植物体内异戊烯基腺嘌呤与反式玉米素的含量水平，在植物生长发育过程中发挥重要作用。在林木树种中鲜有细胞分裂素羟化酶基因克隆和鉴定的相关报道，该文首次在针叶树种马尾松（*Pinus massoniana* Lamb.）中采用 cDNA 末端快速克隆（RACE）技术克隆并鉴定出 1 个 *CYP735A* 基因。马尾松 *CYP735A* 基因（*PmCYP735A*）cDNA 全长为 1 744 bp，包括 1 647 bp 的开放阅读框，44 bp 的 5'端非翻译区和 53 bp 的 3'端非翻译区。该基因编码蛋白由 548 个氨基酸残基组成，其二级结构含有丰富的α-螺旋和无规则卷曲。该基因编码蛋白不含跨膜区域，且无信号肽酶切位点，在第 399-406 和 475-484 个氨基酸残基存在 P450 超家族保守特征序列 ETLRLYP（ExxRxxP）和血红素结合区域（Heme-binding region）FSFGPRKCVG（FxxGxRxCxG）。系统进化树分析表明，马尾松 PmCYP735A 与水稻、玉米、拟南芥 CYP735A 蛋白归属于同一小的进化枝，而可可、毛果杨、麻风树和橡胶树等的 CYP735A 同源蛋白相对集中的定位于另一进化分支。实时定量 PCR 检测发现，*PmCYP735A* 基因在马尾松根和茎中的表达量显著高于叶，该基因响应外源生长素 NAA 诱导表达，随着诱导时间呈现出先上升再下降的表达趋势。该研究结果有助于深入探究 *CYP735A* 基因家族的生物学功能及其在物种间的表达调控异同，为进一步挖掘马尾松优异基因资源奠定基础。

关键词：细胞分裂素羟化酶，RACE，表达模式，马尾松，系统进化分析

Cloning and expression analysis of cytokinin hydroxylase gene *PmCYP735A* in *Pinus massoniana* Lamb.

XU Mengxuan[1,2], WU Ling[1,2], LEI Yandong[1,2], XU Li'an[1,2*], XU Meng[1,2]

(1. *Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China*, *Nanjing Forestry University*, Nanjing 210037; 2. *College of Forestry*, *Nanjing Forestry University*, Nanjing 210037)

Abstract: Cytokinin is a sort of adenine derivatives that can promote cell division and differentiation, which is widely involved in plant organ morphogenesis and stress response. Cytokinin hydroxylase CYP735A belongs to the cytochrome P450 monooxygenase superfamily. It regulates the content of isoprenyl adenine and trans-zeatin in plants through hydroxylation reaction and plays an important role in plant growth and development. Up to now, there were few researches about gene cloning and analysis of cytokinin hydroxylase in woody plants. In this study, one *CYP735A* homologous gene was firstly cloned and identified for the first time in *Pinus massoniana* Lamb. through the rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full-length of cDNA of *PmCYP735A* was 1 744 nucleotides, including 1 647 bp open reading frame (ORF), 44 bp 5'-untranslated region (UTR) and 53 bp 3'-UTR. *PmCYP735A*

基金项目：广西科技重大专项（桂科 AA17204087-1）；国家自然科学基金（31560216）[Supported by the Science and Technology Major Program of Guangxi (AA17204087-1); the Natural Science Foundation of China (31560216)]。

作者简介：徐梦璇（1994），女，安徽省芜湖县，硕士，林木分子生物学，atrecee@outlook.com。

***通信作者：**徐立安，博士，教授，林木遗传育种，laxu@njfu.edu.cn。

may encode a protein of 548 amino acids, and its secondary structure was rich in alpha helix and random coil. PmCYP735A protein did not contain either transmembrane region or signal peptidase cleavage site. But two conserved motifs of P450 superfamily such as ETLRLYP (ExxRxxP) and heme-binding region FSFGPRKCVG (FxxGxRxCxG) were existed in amino acid sequence of 399-406 aa and 475-484 aa, respectively. The phylogenetic tree showed that PmCYP735A was clustered into the same evolutionary branch with homologous of *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, and *Zea mays*, while CYP735A homologous proteins from *Theobroma cacao*, *Populus trichocarpa*, and *Jatropha curcas* were classified in another evolutionary branch. The results of qRT-PCR showed that *PmCYP735A* expressed significantly higher in roots and stems than leaves. Furthermore, the gene may respond to exogenous auxin NAA since the gene expression trend was increased firstly and then decreased over treatment time in all three tissues. These results will be valuable for further study of the biological function of *CYP735A* homologous genes in woody plants and enriched the excellent genetic resources of *P. massoniana*.
Key words: cytokinin hydroxylase, RACE, expression pattern, *Pinus massoniana* Lamb., phylogenetic analysis

细胞分裂素（cytokinin）是一类促进细胞分裂与分化的腺嘌呤衍生物，根据其嘌呤环第 6 位氮原子（N^6）上侧链结构，天然细胞分裂素可分为异戊二烯类和苯环类，后者在植物体内含量极微。异戊二烯类是细胞分裂素在植物体内的主要存在形式，包括反式玉米素（*trans*-zeatin，*t*Z）、异戊烯基腺嘌呤（isopentenyl adenine，iP）、顺式玉米素（*cis*-zeatin，*c*Z）、二氢玉米素（dihydrozeatin，DZ）以及它们的核苷、核苷酸和糖苷等（Takei et al., 2004；Sakakibara，2006）；不同结构形态（iP/*t*Z/*c*Z 及其核苷、核苷酸和糖苷等）的功效组分在不同植物和同种植物的不同组织器官或发育阶段会有较大差异，同时它们在特定条件下还可以相互转化以维持和调节游离态细胞分裂素的活性水平（张红梅等，2003；Kieber & Schaller，2018）。

细胞分裂素的生物合成有两种方式：tRNA 分解和从头合成。tRNA 通过释放出 *c*Z 并在顺反异构酶的催化下转化成高活性 *t*Z 这条途径是其生物合成的次要途径（Mok & Mok，2001；Haberer and Kieber，2002；Veach et al., 2003），以异戊烯基侧链为底物的从头合成是绝大多数内源细胞分裂素产生的主要途径（邓岩等，2006）。人们对细胞分裂素从头合成途径的了解和认知源于几种关键酶及其编码基因的发现（Takei et al., 2004；Sakakibara，2006，邓岩等，2006；李志康等，2018）。异戊烯基转移酶（isopentenyl transferase，IPT）是细胞分裂素合成的限速酶，可催化磷酸腺苷（ATP/ADP/AMP）与二甲基丙烯基二磷酸（dimethylallyl diphosphate，DMAPP）作用转化为磷酸异戊烯基腺苷（iPRTP/iPRDP/iPRMP），继而产生异戊烯基腺苷（iP riboside，iPR）；细胞分裂素羟化酶 CYP735A 能将上述磷酸异戊烯基腺苷经羟基化转化为反式玉米素核苷（*t*ZRTP/*t*ZRDP/*t*ZRMP），并合成反式玉米素核苷（*t*Z riboside，*t*ZR）。*LONELY GUY*（*LOG*）基因编码的磷酸核糖水解酶可以进一步将 iPR 和 *t*ZR 转化为具有生物活性的、自由基形式的 iP 和 *t*Z；与此同时，细胞分裂素的合成代谢还受到细胞分裂素氧化酶、*N*-葡糖基转移酶、玉米素-*O*-葡糖基转移酶和 β -葡糖苷酶等的精确调控（邓岩等，2006；李志康等，2018；Kieber & Schaller，2018）。

马尾松（*Pinus massoniana* Lamb.）是松科松属针叶树种，为多年生常绿乔木，在苏、皖、浙、湘、赣、闽、云贵及两广地区皆有分布。马尾松长势快、干形通直且耐干旱贫瘠，是我国南方地区重要的用材、荒山造林和工业原料树种。松木广泛应用于建筑、枕木、矿柱、家具及制浆造纸等；树干可割取松脂，为医药和化工原料；树皮可提取栲胶；根部可培养茯苓等蕈类，系名贵滋补中药材。如前所述，细胞分裂素羟化酶 CYP735A 属于细胞色素 P450 单加氧酶家族成员，它通

过羟基化作用调控植物体内 *tZ* 的含量水平，在植物茎的生长发育过程中扮演关键角色（Kiba et al., 2013；Cai et al., 2018）。在林木树种中鲜有细胞分裂素羟化酶基因克隆和鉴定的相关报道，本研究首次在针叶树种马尾松中克隆和鉴定了细胞分裂素羟化酶 (cytochrome P450 monooxygenase，family 735，subfamily A)基因 *CYP735A*，以期进一步展开 CYP735A 基因家族的生物学功能研究及其在不同物种间的表达调控异同。

1. 材料与方法

1.1 植物材料及 RNA 提取

植物材料为光照培养箱条件下的马尾松实生苗。用 5 μM 浓度的 NAA 溶液浇灌马尾松幼苗（5 周苗龄），分别于 0 h（CK）、1 、2 、4、8 h 等 5 个时间点取其根、茎和叶组织样本，经液氮速冻后于-80 ℃保存。使用 RNApre Pure Plant Kit（Polysaccharides & Polyphenolics-rich）（TIANGEN，北京）提取上述植物材料总 RNA，经 NanoDrop™ 2000 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度，并使用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。

1.2 基因克隆

根据已获得的目的基因片段序列设计 RACE 特异引物（表 1），以 0 h（CK）马尾松幼苗 RNA 为模板，参照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 操作指南进行目的基因 3’-RACE 和 5’-RACE 巢式 PCR 扩增，并经产物回收、连接、转化、序列测定、拼接、开放阅读框（open reading frame，ORF）预测及其测序验证，最终获得目的基因 cDNA 全长序列。

表 1 *PmCYP735A* 的引物序列

Table 1 Primer sequences of *PmCYP735A*

引物名称 Primer_ID	正向引物（5’-3’） Forward Primer（5’-3’）	反向引物（5’-3’） Reverse Primer（5’-3’）
基因片段 unigene	ACATACTGGTGGAAGCCGAGAAG	CCTCCTTCTTTAGTTCCAACACC
3’RACE 外引物 3’Outer primer	GGCTAATGGCGAAGACTGGGCGAAC	ACTCTGCGTTGATACCACTGCTTGCCCTAT AGTGAGTCGTATTAG
3’RACE 内引物 3’ Inner primer	GTGGAGATTGAGGTGGGCGAGCATT	GCCCTATAGTGAGTCGTATTAG
5’RACE 外引物 5’ Outer primer	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT	CCACCTCAATCTCCACAGTTCCGCC
5’RACE 内引物 5’ Inner primer	CTAATACGACTCACTATAGGGC	CTATGACACGCCGCTGGTTCGC
开放阅读框 ORF	ATGTCTCAGCTGGAGGAAGGAGG	CTATGGATCAATTCTGATTGTTG
实时定量 PCR qRT-PCR	GGCGTTGTTCTCGACTTCCG	GAGCAGCAATCCCAGGAGGT
内参基因 Reference gene	AGCTCCGACACCATTGATAA	TGGAAGATGGACGTACTTTGG

1.3 序列分析

候选基因片段、3’RACE 和 5’RACE 序列比对拼接使用 BioEdit 软件，基于获取的候选基因 cDNA 全长序列利用在线分析工具 FGENESH 预测 ORF。首次利用在线软件 Expasy Protparma 和 ProtScale 分析候选基因编码蛋白的理化性质，包括蛋白质分子量、理论等电点、氨基酸组成以及疏水性；其次，使用 TMHMM v.2.0 Server、SignalP 4.1 Server 和 Cell-Ploc 2.0 工具进行开展目的蛋白跨膜区、信号肽和亚细胞定位预测。通过 Pfam 数据库预测候选基因编码蛋白质的保守结构域，并借助 SOPMA 和 Swiss-Model 软件预测蛋白质的高级结构。

1.4 系统进化树构建

不同物种的氨基酸序列使用 DNAMAN 软件进行多重比对，使用 MegaX 软件并采用邻接法构建系统进化树。

1.5 实时定量 PCR

将前述样品的总 RNA 经 PrimeScript™ RT Master Mix（TaKaRa，大连）反转录合成 cDNA。在 ViiA™ 7 平台，使用不饱和荧光染料 FastStart Universal SYBR Green Master（ROX）开展候选基因实时定量 PCR 检测，反应体系和反映程序参照其说明书。每个样品均进行三次技术重复，以 *UBI4* 基因（Chen et al., 2016）为内参基因，基于 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法进行目的基因在 NAA 处理不同时间的不同组织中的相对表达分析。

2. 结果与分析

2.1 马尾松 *PmCYP735A* 基因克隆及序列分析

通过 NCBI 数据库比对结果显示，目的基因所编码蛋白质具备 P450 结构域，且与其他物种细胞分裂素羟化酶同源性较高。将该基因编码氨基酸序列与拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）细胞色素 P450 家族所有成员进行 BLAST 比对和系统进化分析，发现该预测蛋白质与拟南芥 CYP735A 家族关系最为接近，而之前尚未有 *CYP735A* 基因亚家族在针叶树种中克隆和验证的报道，因此我们将该基因命名为 *PmCYP735A*。马尾松 *PmCYP735A* 基因 cDNA 全长为 1 744 bp，其中包括 1 647 bp 的 ORF 区域，长度为 44 bp 的 5’端非翻译区（5’-UTR）和 53 bp 的 3’端非翻译区（3’-UTR）；该基因序列在 45~47 位为起始密码子 ATG，下游存在同框终止密码子 TAG 和 ployA 尾（图 1）；可编码 548 个氨基酸，其编码蛋白质分子式为 $C_{2793}H_{4406}N_{770}O_{773}S_{26}$，相对分子质量（MW）为 61.93 kD，理论等电点（pI）为 9.37；不稳定系数为 37.04，为稳定蛋白；总亲水性平均系数为-0.118，预测其为亲水性蛋白。

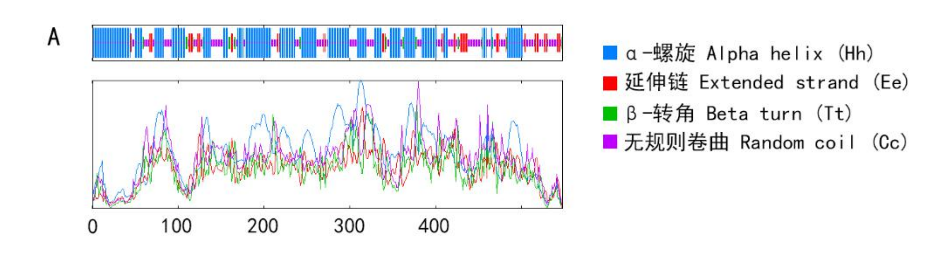
```
1                                                M  S  Q  L  E  E  G  G  A  A  A
1     gacacacgcgcacacagctttctcgatctcttctggcggccaatATGTCTCAGCTGGAGGAAGGAGGAGCTGCTG
12     H  A  Q  H  I  V  E  I  F  M  I  V  F  M  L  P  M  L  R  L  S  T  I  V  W
76    CTCATGCTCAGCATATCGTCGAAATATTCATGATAGTATTTATGCTACCAATGTTAAGGCTATCGACGATCGTCT
37     K  Q  L  C  N  F  I  Y  T  Y  W  W  K  P  R  S  I  R  K  I  M  E  S  Q  G
151   GGAAGCAGCTCTGCAATTTTATATACACATACTGGTGGAAGCCGAGAAGTATCAGGAAAATTATGGAAAGTCAAG
62     I  R  G  P  T  P  R  F  I  T  G  N  L  G  E  M  T  K  L  R  E  L  R  T  A
226   GTATCAGAGGCCCAACTCCTCGCTTTATCACTGGAAATCTGGGCGAGATGACTAAATTAAGAGAGCTCAGGACTG
87     K  D  M  D  P  I  S  H  D  I  V  D  R  L  L  P  H  Y  V  K  W  T  H  D  Y
301   CTAAAGACATGGATCCTATCAGTCATGATATTGTGGACAGACTCTTGCCGCACTATGTGAAATGGACACACGATT
112    G  R  R  F  I  F  W  W  G  I  E  P  R  L  T  I  T  E  P  E  L  I  K  E  L
376   ATGGCCGGCGCTTCATCTTCTGGTGGGGCATCGAACCCCGGCTGACAATTACAGAGCCAGAGCTAATCAAAGAAC
137    L  S  A  K  H  G  L  S  Y  G  K  S  Q  L  Q  Q  K  G  V  K  N  F  I  G  K
451   TTTTGTCTGCGAAGCACGGTCTCTCATATGGGAAATCTCAACTGCAGCAAAAAGGTGTGAAGAATTTCATTGGAA
162    G  L  L  M  A  N  G  E  D  W  A  N  Q  R  R  V  I  A  P  A  F  H  Q  E  N
526   AAGGCCTGTTGATGGCTAATGGCGAAGACTGGGCGAACCAGCGGCGTGTCATAGCTCCTGCGTTTCACCAGGAGA
187    L  K  G  Q  V  S  F  M  I  E  S  T  K  Y  M  I  N  E  W  K  K  N  V  E  E
601   ATCTCAAGGGACAAGTATCATTCATGATTGAAAGTACAAAATATATGATAAACGAGTGGAAGAAAAATGTGGAGG
212    G  G  G  T  V  E  I  E  V  G  E  H  F  A  R  L  A  A  D  I  I  A  K  T  E
676   AAGGGGGCGGAACTGTGGAGATTGAGGTGGGCGAGCATTTCGCCCGCTTGGCGGCAGATATCATAGCGAAGACGG
237    F  G  S  S  Y  E  G  G  K  R  V  F  E  K  L  G  L  L  Q  K  L  A  S  R  A
751   AATTTGGGAGTAGCTACGAAGGGGGAAAACGAGTTTTCGAGAAGCTGGGTCTACTGCAGAAGCTGGCATCCCGTG
262    G  R  C  S  R  L  P  G  S  R  F  G  V  N  R  Q  V  L  E  L  K  K  E  V  E
826   CTGGGCGTTGTTCTCGACTTCCGGGTAGCAGATTTGGGGTGAATAGACAGGTGTTGGAACTAAAGAAGGAGGTGG
287    E  S  L  Q  R  L  V  E  A  R  R  G  S  V  S  M  G  R  S  C  S  Y  G  H  D
901   AGGAATCTCTGCAGCGATTGGTAGAGGCCCGGCGAGGCTCAGTGAGCATGGGGCGGAGTTGTTCATATGGCCATG
312    L  L  G  L  L  L  A  E  S  E  K  L  G  A  T  P  F  T  S  Q  E  L  I  D  Q
976   ACCTCCTGGGATTGCTGCTCGCTGAGAGCGAGAAGCTGGGAGCCACGCCGTTCACATCGCAAGAGCTGATAGACC
337    C  K  T  F  F  F  A  G  Q  D  T  T  C  T  L  L  T  W  T  T  M  L  L  A  L
1051  AGTGCAAGACTTTTTTCTTTGCAGGTCAGGACACCACGTGCACTCTACTTACGTGGACAACCATGTTGCTCGCAC
362    H  P  E  W  Q  R  R  A  R  D  E  V  L  A  V  C  G  G  G  P  P  D  S  N  T
1126  TCCATCCGGAATGGCAGCGGCGAGCTCGCGACGAAGTTCTAGCCGTGTGCGGTGGCGGCCCTCCTGATTCTAATA
387    L  Q  N  L  K  I  M  G  M  I  L  K  E  S  L  R  L  Y  T  P  A  S  L  F  A
1201  CTCTTCAAAATTTAAAAATCATGGGAATGATATTGAAGGAATCATTGCGACTGTACACTCCTGCAAGTTTATTCG
412    K  E  A  F  T  D  M  K  L  G  D  L  F  I  P  K  G  L  S  V  W  I  P  V  L
1276  CCAAAGAAGCATTCACAGACATGAAACTGGGCGACCTGTTCATACCAAAGGGACTGTCAGTATGGATTCCCGTGC
437    A  I  H  H  D  K  N  I  W  G  E  D  A  N  D  F  N  P  E  R  F  S  Q  G  T
1351  TGGCCATTCATCACGACAAGAACATATGGGGTGAAGATGCCAACGACTTCAATCCAGAGAGGTTTTCTCAGGGTA
462    A  K  A  C  R  N  N  P  M  G  F  I  P  F  S  F  G  P  R  K  C  V  G  Q  T
1426  CTGCAAAGGCGTGCAGAAACAATCCCATGGGCTTCATACCATTTTCCTTCGGTCCTCGCAAGTGCGTGGGGCAGA
487    F  A  I  M  E  A  K  I  V  L  A  M  I  I  T  T  F  T  F  H  L  S  P  S  Y
1501  CTTTTGCCATCATGGAAGCCAAAATTGTGCTGGCCATGATCATCACAACTTTCACGTTTCATTTATCTCCTTCCT
512    R  H  A  P  I  S  V  L  T  L  K  P  R  H  G  V  R  V  I  F  R  P  A  N  I
1576  ATCGCCACGCCCCCATTTCTGTACTCACGCTCAAGCCCCGCCATGGCGTCCGAGTCATATTCCGCCCAGCCAACA
537    N  S  T  S  A  T  T  I  R  I  D  P  *
1651  TTAATTCAACGTCAGCGACAACAATCAGAATTGATCCATAGctttcatggaaaacagaggacggtggaaaaaaaa
1726  aaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

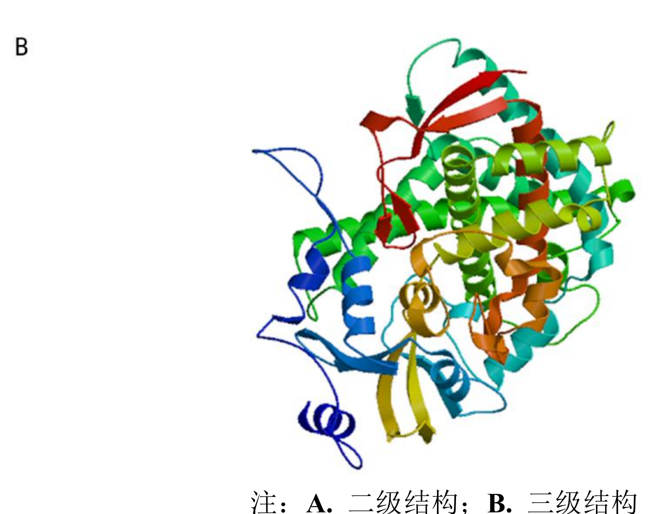
图 1 *PmCYP735A* 基因 cDNA 全长及预测氨基酸序列

Fig. 1 Full-length cDNA and its deduced amino acid sequences of *PmCYP735A*

2.2 二级结构与三级结构预测

马尾松 *CYP735A* 基因编码蛋白不含跨膜区域，预测位于内质网，且无信号肽酶切位点，推测该编码蛋白为非分泌性亲水性蛋白。其二级结构含有 52.55%的α-螺旋（Alpha helix）、10.95%的延伸链（Extended strand）、4.74%的β-转角（Beta turn）和 31.75%的无规则卷曲（Random coil）。以 CYP BM3（Cytochrome P450 pentamutant from BM3 with bound PEG）（SMIT ID：4zf6.1）为模板，获得马尾松 PmCYP735A 蛋白质三级结构（图 2B），两者的序列具有 26.26%的一致性，模板覆盖率为 83%（图 2B）。





注：**A.** 二级结构；**B.** 三级结构

Note: **A.** Secondary Structure; **B.** Tertiary Structure.

图 2 PmCYP735A 蛋白二级结构与三级结构预测

Fig. 2 The secondary and tertiary structures of PmCYP735A

2.3 马尾松 CYP735A 蛋白质保守结构域分析

Pfam 数据库检索显示，马尾松 *PmCYP735A* 蛋白质在 4~349 氨基酸残基范围内存在 P450 蛋白的保守结构域。目前有关 CYP735A 亚家族蛋白的功能研究较为缺乏，NCBI 数据库 Blast 比对显示，马尾松 PmCYP735A 氨基酸序列与拟南 CYP735A1（*Arabidopsis thaliana*，NP_001331437.1）（Takei et al., 2004）和麻风树（*Jatropha curcas*，XP_012077971.1）（Cai et al., 2018）的一致性分别为 51% 和 52%。将 PmCYP735A 蛋白与拟南芥 AtCYP735A1 和 AtCYP73A2、麻风树 JcCYP735A 、水稻 OsCYP735A3 （*Oryza sativa* ， XM_015794046.2 ） 和 OsCYP735A4（XM_015755276.1）和玉米 ZmCYP735A（*Zea mays*，PWZ_25384.1）（李晓丽，2011）等已有文献报道的 CYP735A 同源蛋白进行多重序列比对（图 3）。所有已知的细胞色素 P450 家族成员都含有保守的血红素结合域（Heme-binding region），通过多序列比对发现在 PmCYP735A 蛋白在第 399~406 和 475~484 个氨基酸残基存在保守特征序列 ETLRLYP（ExxRxxP）（Hasemann et al., 1994）和血红素结合区域（Heme-binding region）FSFGPRKCVG（FxxGxRxCxG）（Nelson et al., 1993）。

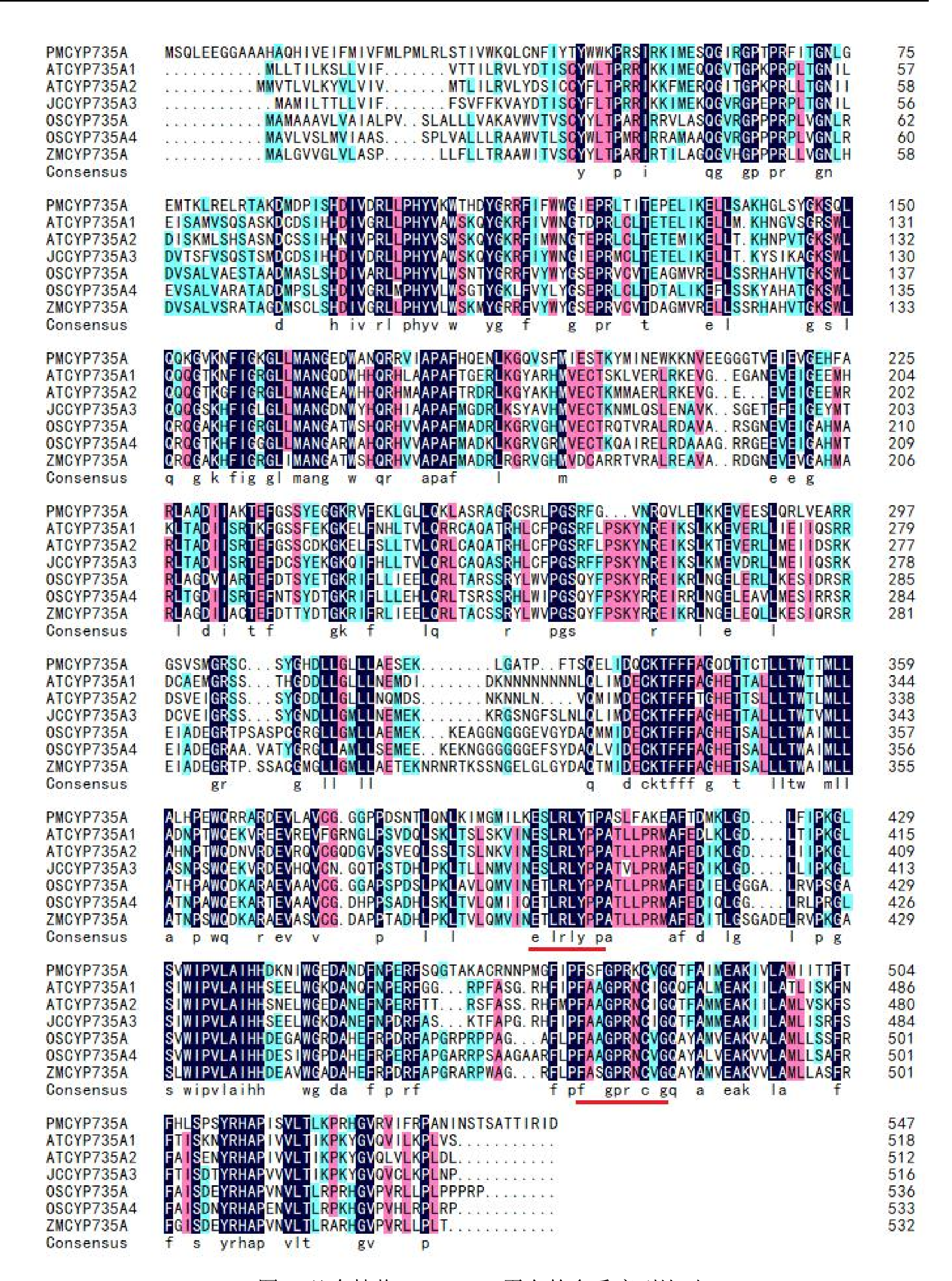


图 3 几个植物 CYP735A 蛋白的多重序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of serval proteins in CYP735A subfamily

2.4 CYP735A 蛋白系统进化分析

将上述已有文献报道的 CYP735A 家族蛋白与可可 TcCYP735A（*Theobroma cacao*，EOY_04208.1）、向日葵 HaCYP735A（*Helianthus annuus*，OTG_05700.1）、毛果杨 *PtCYP735A*（*Populus trichocarpa*，XP_006383462）、蓖麻 *RcCYP735A*（*Ricinus communis*，XM_002516677.2）、

橡胶树 *HbCYP735A*（*Hevea brasiliensis*，XP_021643892.1）和川桑 *MnCYP735A*（*Morus notabilis*，EXB_97152.1）等其他物种基因组上预测到的部分 CYP735A 同源蛋白经多重序列比对后构建系统进化树（图 4）。马尾松 PmCYP735A 与水稻、玉米、拟南芥 CYP735A 蛋白归属于同一小的进化枝，而可可、毛果杨、麻风树和橡胶树等的 CYP735A 同源蛋白相对集中的定位于另一进化分支。

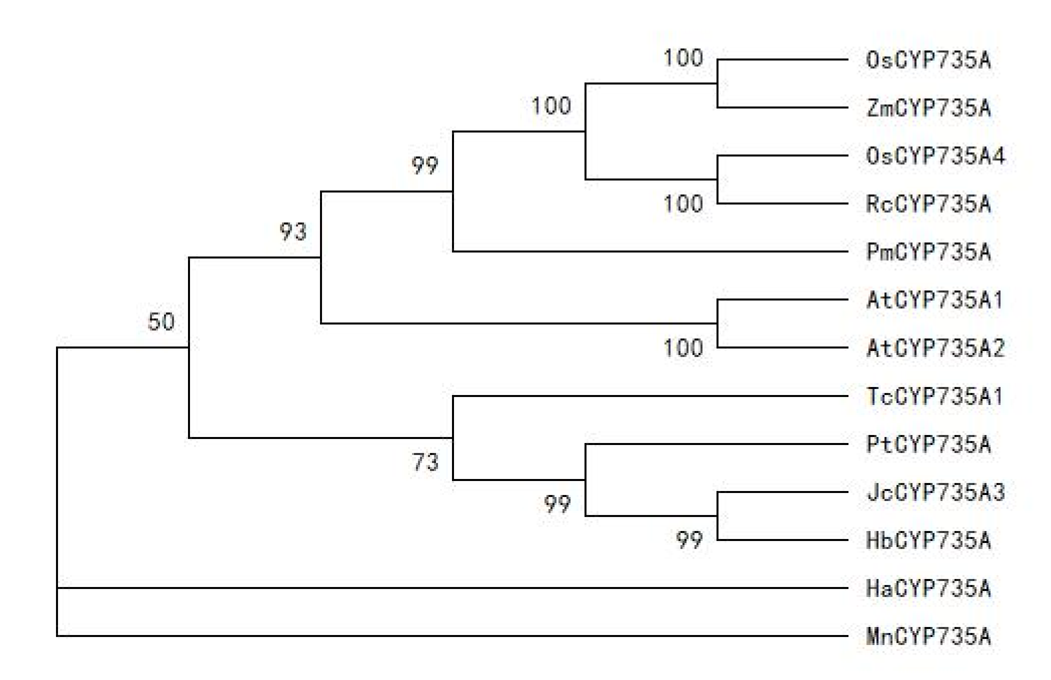


图 4 细胞分裂素羟化酶蛋白系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of several cytokinin hydroxylase proteins

2.5 *PmCYP735A* 基因表达模式分析

为了检测 *PmCYP735A* 基因在马尾松不同组织及外源激素 NAA 处理下的表达模式，以 *UBI4* 为内参基因，进行目的基因实时定量 PCR 检测。结果显示，*PmCYP735A* 基因在马尾松根茎中的表达量显著高于叶。在使用 5 μmol/L 浓度 NAA 溶液浇灌处理条件下，0~2 h 内 *PmCYP735A* 基因在各组织中的表达量呈上升趋势，而从 2 h 到 4 h 内，该基因在各组织中的表达量急剧下降；尤其有趣的是，该基因快速地响应外源生长素 NAA 诱导表达，且先上升再下降的这一表达趋势在根、茎、叶中保持一致（图 5）。

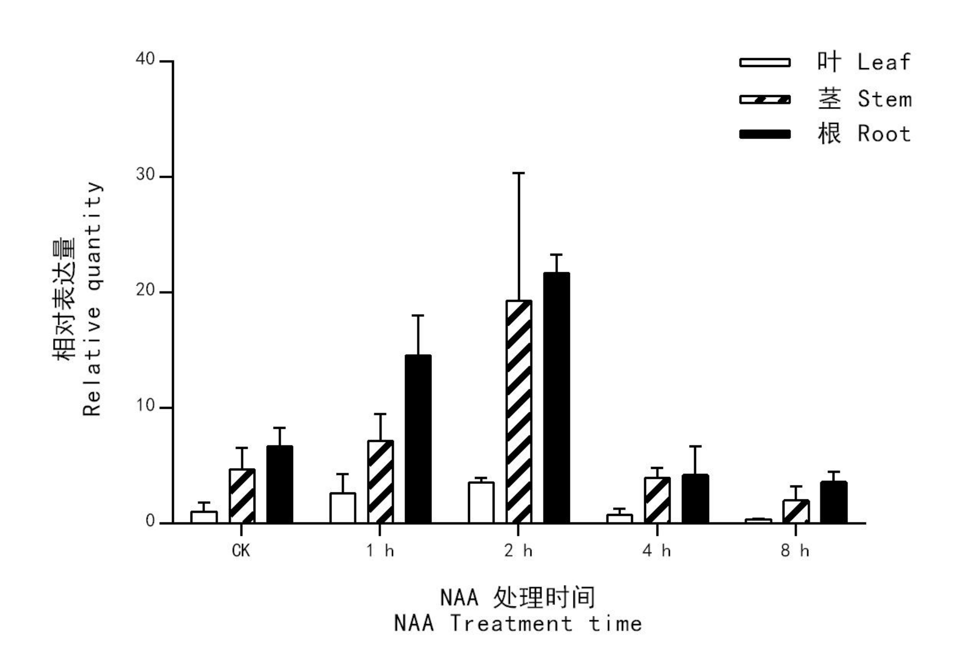


图 5 NAA 处理下 *PmCYP735A* 基因的表达模式

Fig. 5 Expression pattern of *PmCYP735A* under treatment with NAA

3. 讨论

植物激素是植物正常代谢所产生的一类对其生长发育和胁迫响应有显著作用的微量有机化合物，包括生长素（auxin）、细胞分裂素、赤霉素（GA）、乙烯（ETH）、脱落酸（ABA）、油菜素内酯（brassinosteroid，BR）等。细胞分裂素与其它信号途径之间存在最为活跃的相互作用，它通过对细胞增殖与分化的调节而广泛参与调控植物形态建成、顶端优势、营养物质运输及逆境适应等（邓岩等，2006；李志康等，2018）。反式玉米素（*t*Z）和异戊烯基腺嘌呤（iP）是植物体内细胞分裂素主要的活性形式，前者主要在根系中合成并通过木质部转运至叶片，而后者主要在地上部分合成并通过韧皮部运输至根系发挥作用（Ko et al., 2014；Zhang et al., 2014；李志康等，2018）。细胞分裂素羟化酶 CYP735A 催化核苷酸形式的 iPR 转化成核苷酸形式的 *t*ZR，从而参与调节不同细胞分裂素组分在植物体内的动态平衡。

拟南芥中存在 *AtCYP735A1* 和 *AtCYP735A2* 两个细胞分裂素羟化酶基因，其氨基酸序列一致性为 79 %，它们主要在根茎维管束中表达。*AtCYP735A1* 在根、茎、叶和花中均有低量表达，而 *AtCYP735A2* 主要在根维管束表达；其双突变体拟南芥植株，根茎 *t*Z 含量降低，茎的生长发育受抑制（Takei et al., 2004；Kiba et al., 2013）。基于最近麻风树 *JcCYP735A* 基因的研究报道，有理由相信 *CYP735A* 同源基因在多年生木本植物中也有相似的生物学功能，在根中参与合成 *t*Z，*t*Z 通过木质部转运至地上部分调控相应组织器官的生长发育。*JcCYP735A* 基因在麻风树所有的组织器官中均有表达，而根中表达量最高；其敲除转基因植株生长发育严重滞，株高仅仅是对照植株的四分之一，叶片 *t*Z、*t*ZR、*c*Z 和 cZR 的含量显著减低（Cai et al., 2018）。

迄今为止，还没有克隆和鉴定针叶树种 *CYP735A* 基因的有关报道。本研究通过 RACE 和测序验证获取了马尾松 *PmCYP735A* 基因 cDNA 全长序列，并对其进行了生物信息学分析和表达模式实时定量 PCR 检测，旨在探究其生物学功能及它们在物种间的表达调控异同，并为进一步挖掘马尾松优异基因资源奠定基础。

参考文献

CAI L, ZHANG L, FU Q, et al., 2018. Identification and expression analysis of cytokinin metabolic genes IPTs, CYP735A and CKXs in the biofuel plant *Jatropha curcas*[J]. PeerJ, 6(2): e4812.

CHEN H, YANG Z, HU Y, et al., 2016. Reference genes selection for quantitative gene expression studies in *Pinus massoniana* L[J]. Trees, 30(3): 685-696.

DENG Y, WANG XC, YANG SH, et al., 2006. New insights into cytokinins: metabolism, signal transduction, cross talks and potentials in agricultural applications[J]. Chin Bull Bot, 23(5): 478-498. [邓岩，王兴春，杨淑华等，2006. 细胞分裂素：代谢、信号转导、交叉反应与农艺性状改良[J]. 植物学通报，23(5)：478-498.]

HABERER G, KIEBER JJ, 2002. Cytokinins: New insights into a classic phytohormone[J]. Plant Physiol, 128(2): 354-362.

HASEMANN CA, RAVICHANDRAN KG, PETERSON JA, et al., 1994. Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 A resolution[J]. J Mol Biol, 236(4): 1169-1185.

KIBA T, TAKEI K, KOJIMA M, et al., 2013. Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in *Arabidopsis*[J]. Dev Cell, 27(4): 452-461.

KIEBER JJ, SCHALLER GE, 2018. Cytokinin signaling in plant development[J]. Development, 145(4): dev149344.

KO D, KANG J, KIBA T, et al., 2014. Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 111(19): 7150-7155.

LACOMBE B, ACHARD P, 2016. Long-distance transport of phytohormones through the plant vascular system[J]. Curr Opin Plant Biol, 34: 1-8.

LI XL, 2011. Establishment of immature embryo transgenic acceptor system and transformation of CYP735A gene by agrobacterium tumefaciens in three maize inbred-lines[D]. Shandong: Shandong Agricultural University. [李晓丽，2011. 3 个玉米自交系幼胚转化受体系统建立和 CYP735A 基因的农杆菌介导转化[D]. 泰安：山东农业大学.]

LI ZK, YAN D, XUE ZY, et al., 2018. Regulations of plant growth and development by cytokinins and their applications in rice production[J]. Chin J Rice Sci, 32(4): 311-324. [李志康，严冬，薛张逸等，2018. 细胞分裂素对植物生长发育的调控机理研究进展及其在水稻生产中的应用探讨[J]. 中国水稻科学，32(4)：311-324.]

MOK DW, MOK MCM, 2001. Cytokinin metabolism and action[J]. Ann Rev Plant Physiol, 52(52): 89-118.

NELSON DR, KAMATAKI T, WAXMAN DJ, et al., 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature[J]. DNA Cell Biol, 12(1): 1-51.

NELSON DR, MING R, ALAM M, et al., 2008. Comparison of cytochrome P450 genes from six plant genomes[J]. Trop Plant Biol, 1(3-4): 216-235.

SAKAKIBARA H, TAKEI K, HIROSE N, 2006. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development[J]. Trends Plant Sci, 11(9): 440-448.

TAKEI K, YAMAYA T, SAKAKIBARA H, 2004. Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin[J]. J Biol Chem, 279(40): 41866-41872.

VEACH YK, MARTIN R C, MOK DWS, et al., 2003. O-glucosylation of cis-zeatin in maize. characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins[J]. Plant Physiol, 131(3): 1374-1380.

ZHANG HM, WANG JL, LIAO XR. Biosynthesis, metabolism and receptor of cytokinins[J]. J Plant Physiol, 2003, 39(3): 267-272. [张红梅，王俊丽，廖祥儒，2003. 细胞分裂素的生物合成、代谢和受体[J]. 植物生理学报，39(3)：267-272.]

ZHANG K, NOVAK O, WEI Z, et al., 2014. Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins[J]. Nat Comm, 5(2): 3274.